

ラット初代培養肝細胞におけるインスリンの 蛋白合成に及ぼす影響

金沢大学医学部内科学第二講座 (主任：竹田亮祐教授)

久津見 恭 典

(昭和60年5月2日受付)

ストレプトゾトシン糖尿病ラット (糖尿病ラット) および正常成熟ラット (対照ラット) から調製した培養肝細胞を用いて、蛋白合成に及ぼすインスリンの長期効果の作用機序について検討した。血清中の諸因子の影響を除外する目的で、肝細胞は無血清培地 (HI/WO₅/BA₂₀₀₀) を用い、5%二酸化炭素と95%空気との気相下、37°Cの状態 で培養した。肝細胞播種後、最適条件下で24時間培養した肝細胞は、代謝の面からも形態の面からも、成熟ラットの生体肝細胞と同等の状態を十分に反映していた。蛋白合成は、¹⁴Cで標識したロイシンのトリクロール酢酸不溶性分画への取り組み、および抗ラットアルブミン血清を使用して得た沈殿物への標識ロイシンの取り込みを指標とした。糖尿病ラットおよび対照ラットから調製した培養肝細胞において、トリクロール酢酸不溶性蛋白とアルブミンの合成は、時間経過とともに培養24時間までは直線的に増加した。しかし糖尿病ラット培養肝細胞でのこれらの蛋白合成量は、対照ラットに比して低下していた。対照ラットから調製した培養肝細胞では、これらの蛋白合成はインスリンを培地へ添加することで明らかな合成能の増加を示さなかった。しかし糖尿病ラットから調製した培養肝細胞では、10⁻⁸Mのインスリンを培地に添加することにより、培養初期の蛋白合成量は対照に比して4倍もの増加を示した。一方糖尿病ラットおよび対照ラットから調製した培養肝細胞でのインスリンレセプターをスキッチャード解析した結果、親和性は両者とも4.4~5.7×10⁻⁹Mと同数であった。しかしインスリンレセプター数は、糖尿病ラット培養肝細胞で、対照に比して約2倍を有していた。さらに糖尿病ラット培養肝細胞では、インスリン分解能も対照ラットで亢進していた。この様に糖尿病ラットから調製した培養肝細胞の方がインスリンに対して、より感受性が增大していたが、これはインスリンに対する応答性の差異が、少なくともレセプターの性状の差異に基づくことを示唆するものと考えられた。最後に巨大分子であるインスリン・デキストラン複合体 (複合体) が、培養肝細胞においてインスリンと同様、蛋白合成を促進させることを示した。3種類の複合体 (I, 分子量150,000; II, 分子量450,000; III, 分子量2,000,000) を実験に供したところ、複合体 (I) はインスリンと同様の効果を示した。一方複合体 (II) ではインスリンの67%の促進効果を示し、複合体 (III) では程度は弱いながらも蛋白合成促進効果を示した。これらの結果から、インスリン作用の発現には、必ずしもインスリンが細胞内へ取り込まれる必要はないと考えられた。

Key words serum free medium, protein synthesis, insulin, cultured hepatocytes.

インスリンの作用機序を解明する目的で、リンパ球¹⁾、脂肪細胞²⁾をはじめとして各種の生体膜^{3,4)}を用いた *in vitro* の研究が精力的になされている。Goldfine は細胞レベルでのインスリンの作用機序を即時型、中間型、遅延型の3つに大別しており⁵⁾、この観点から見

ると従来の *in vitro* の実験系はインスリンの即時効果のみをとらえていたという短所が指摘される⁶⁾。本研究ではこの欠点を補うために、培養肝細胞を用いることにより蛋白合成に及ぼすインスリンの中間型および遅延型に区分される作用機序を検討した。本論文の主

Abbreviations: DM, Diabetes mellitus; STZ, Streptozotocin; TCA, Trichloroacetic acid.

旨は次の4項に分類される。まず正常ラット(対照ラット)およびストレプトゾトミン糖尿病ラット(糖尿病ラット)から得られた遊離肝細胞を、インスリンの作用がより顕性化された他のホルモン等の影響で修飾されることのないように、血清を加えない培地で培養するという無血清培養実験系を確立した。次に対照ラットおよび糖尿病ラットから調製した無血清培地の培養肝細胞を用いて、インスリンの同細胞の蛋白合成に及ぼす影響について検討した。第3に対照ラットおよび糖尿病ラットにおける蛋白合成の差異をインスリンレセプターの面から検討すると共に、両者におけるインスリン分解過程での差異を明らかにした。最後にインスリンの蛋白合成への効果の発現にインスリンが細胞内へ取り込まれることが必要であるか否かを、細胞内へ取り込まれない巨大分子である複合体を用いて、糖尿病ラット培養肝細胞における蛋白合成の面で検討し、インスリンレセプター機構の一端を解明した。

材料および方法

I. 成熟ラット肝細胞初代単層培養法

24時間絶食後のウィスター系雄性ラット(体重約200g)(北陸ラボウエア、富山)を、チオペンタール(ラボナール、田辺製薬、5mg/100g体重、腹腔内注射)麻酔下に開腹し、門脈より0.05%コラゲナーゼ(class II, Worthington Biochem., N.J.)を含む Krebs-Henseleit bicarbonate buffer (KHB) pH. 7.4 で肝を灌流する Berry らの方法⁷⁾に準じた著者の変法にて肝細胞遊離を行なった。KHB はあらかじめ5%CO₂-95%Airの混合ガスで飽和し、ミリポアフィルター(pore size 0.22μm, Millipore Ltd.)で滅菌濾過後使用した。肝灌流15分後、軟化した肝をラット腹腔内より摘出し、培養液〔Waymouth's MB 752/1 (Flow Laboratories Inc., Va.), ウシアルブミン(fatty acid free, Fraction V, Miles Laboratories Inc., Indiana.)およびオレイン酸(Sigma Chem. Co., Mo.)添加〕中で細胞を遊離し、90メッシュの絹フィルターにて濾過した後、濾液を約400rpm(約30×g)で2分間遠心洗浄をくり返し、40~50mlの肝実質細胞浮遊液を作製した。約2.5~3.0×10⁶個の遊離細胞を培養皿(直径60mm, Falcon Co., Ca.)に播種し、2.5mlの培養液中37°Cで湿潤した5%CO₂-95%Airの気相下にて培養を開始した。培養4時間後、一旦培養液を交換し以後実験に供した。トリパンブルー染色による細胞の非染色率は90~95%であった。またこれらの操作はすべて無菌的条件下で行なった。無血清培地を用いているため培養皿はコラーゲン(Type III, Sigma Chem. CO., Mo.)1mgとヒトフィブロネクチン(Collaborative

Res., Mass.) 50μgでコーディングしたものを使用した。なお本稿で培養開始と記してある時点は、すべて細胞播種後4時間を経過した時点基準としている。培養液の組成は表1に示した。

II. トリクロール酢酸不溶性蛋白の合成量の測定
〔1-¹⁴C〕ロイシン(比放射能56.9mCi/mole, New England Nuclear, Mass.)のトリクロール酢酸(TCA)不溶性分画への取り込みは一定時間培養後0.2N-NaOH 2.5mlを用いて細胞をラバーポリースマンで剥離しsonicatorおよびmicrotip(Heat System Ultrasonic Inc., N.Y. Model W-220F)を用いて45ワット30秒にて超音波破碎した後、1600×g(日立遠心機5PR)30分遠心後上清2mlに50%TCA 0.5mlを加え蛋白質を沈殿させ、沈殿物を10%TCAで2回洗浄後、沈殿物の放射活性を液体シンチレーションカウンター(LSC model 675 Aloka Co.,)で測定した。

III. アルブミンの合成量の測定

培養肝細胞により新しく合成されたアルブミン量は培養液中に〔1-¹⁴C〕ロイシンを添加し、一定時間培養後、細胞内のアルブミンに取り込まれた放射活性によりあらわした。細胞破碎液2mlに200μlの抗ラットアルブミン家兎血清を加え、4°C、12時間静置後さらに抗家兎ヒツジ全血清(Miles Laboratories Inc., Indiana)200μlを加えて、1600×g 15分間遠心して得た沈殿物中の放射活性を測定した。抗ラットアルブミン家兎血清はラットアルブミン(Sigma Chem. Co., Mo.)2mgを毎週家兎に免疫し、約2ヶ月後に採血し抗体価の測定検討を行なった後使用した。

IV. 糖尿病ラットの作成

糖尿病ラットはJunodらの方法⁸⁾に準じて、ウィスター系雄性ラットにストレプトゾトシン(STZ)(Sigma Chem. Co., Mo.)65mg/kg・体重を尾静脈より注射して作成し、注射後1週間にて実験に供した。糖尿病ラットの空腹時血糖は300mg/100ml以上を示し、血中immunoreactive insulin値も対照ラットに比し有意に低下していた。

V. 蛋白量の測定

Lowry法⁹⁾にてウシ血清アルブミン(Sigma Chem. Co., Mo.)を標準として行なった。

VI. 培養肝細胞における蛋白合成の測定

培養開始4時間後に一旦培養液を交換した。その後〔1-¹⁴C〕ロイシンを加え、この時点基準に6時間、12時間、24時間経過後、培地と培養細胞を採取し、前述の方法にてTCA不溶性蛋白およびアルブミンの合成量を測定した。合成に関する実験はtriplicateで実施し、その平均値を用いた。

VII. 培養肝細胞における蛋白合成に及ぼすインスリンの影響についての検討

肝細胞中の生理的濃度に近い 10^{-8} M のインスリンを対照ラットおよび糖尿病ラットから調製した培養肝細胞の培養液中に添加し、TCA 不溶性蛋白およびアルブミンの合成を経時的に測定した。なお 10^{-8} M のインスリンは培養後 6 時間毎に添加し、合成への影響を観察した。

VIII. 培養皿のコートティング

コートティングはウシコラーゲン (Type III, Type IV Sigma Chem. Co., Mo.) とフィブロネクチン (Collaborative Res., Mass.) を用いて行なった。Type IV コラーゲンのコートティングには Lin らの方法¹⁰⁾を用いた。Type III コラーゲンでは Lin らの方法¹⁰⁾と Rubin らの方法¹¹⁾を用いた。フィブロネクチンは 50 μ g を 500 μ l の培養液に溶解し、ファルコン社製プラスチック培養皿 (径 50 mm) の底面全体にコートティングした。フィブロネクチンと Type III コラーゲンとの併用コートティングの方法は、先ず Lin らの方法¹⁰⁾で Type III コラーゲンをコートティングした培養皿を、細胞播種直前に pH の是正のために培養液 1 ml で培養皿を洗浄した後、フィブロネクチン 30 μ g を 300 μ l の培養液に溶

解し、底面全体にこれをコートティングした。

IX. 播種細胞の接着率についての検討

一培養皿あたりに播種した細胞の総蛋白量を A とする。また播種後 4 時間経過した時点での培養皿底に接着した細胞の蛋白量を B とする。接着率は B/A で表示した。

X. インスリンレセプターの性状についての検討

1×10^6 個/2 ml の細胞に対して 0.6 ng の [¹²⁵I] インスリン (比放射能 102 μ Ci/ μ g New England Nuclear, Mass.) を加え、1 倍から 1000 倍の非標識インスリン (ブタインスリン Sigma Chem. Co., Mo.) とともに 15°C, 60 分間、インキュベーション後、Insulin Binding Assay Buffer (Hepes 100mM, NaCl 120mM, KCl 5mM, MgSO 1.2mM, EDTA 1mM, Glucose 10mM, sodium acetate 15mM, BSA 10mg/ml) にて 2 回洗浄後細胞の放射活性をガンマカウンター (RAW 600, Shimadzu,) で測定し、解離定数 (Kd) および最大結合能 (B max) を算出した。

XI. インスリンの分解についての検討

インスリンの分解は [¹²⁵I] インスリン (放射能 102 μ Ci/ μ g New England Nuclear, Mass) の TCA 不溶性分画への取り込みで測定した。各実験毎に培養細胞

Table 1. Composition of modified Waymouth's MB 752/1 (HI/WO₅/BA₂₀₀₀)

Component	(mg/l)		
Inorganic salts		L-Threonine	75.0
NaCl	6000.0	L-Tryptophan	40.0
KCl	150.0	L-Tyrosine	40.0
CaCl ₂ (anhyd)	90.6	L-Valine	65.0
MgSO ₄ (anhyd)	239.8	Vitamins	
Na ₂ HPO ₄	300.0	Glutathione	15.0
NaHCO ₃	1120.0	Ascorbic Acid	17.5
KH ₂ PO ₄	80.0	d-Biotin	0.02
Amino acids		Choline Chloride	250.0
L-Arginine-HCl	75.0	Folic Acid	0.4
L-Aspartic Acid	60.0	Hypoxanthine	25.0
L-Cysteine-HCl-H ₂ O	100.3	L-Inositol	1.0
L-Cystine	15.0	Nicotinamide	1.0
L-Glutamic Acid	150.0	d-Pantothenate (CaSalt)	1.0
L-Glutamine	350.0	Pyridoxine-HCl	1.0
Glycine	50.0	Riboflavin	1.0
L-Histidine-HCl-H ₂ O	164.1	Thiamine-HCl	10.0
L-Isoleucine	25.0	Vitamin B ₁₂	0.2
L-Leucine	50.0	Other components	
L-Lysine-HCl	240.0	Glucose	5000.0
L-Methionine	50.0	Bovine Albumin (Fatty Acid Free)	2000.0
L-Phenylalanine	50.0	Phenol Red (Na Salt)	20.0
L-Proline	50.0	Oleic Acid (Na Salt)	5.4

のない培地のみに添加した [125 I] インスリンを対照とした。分解率は次の式で算出した。

$$\begin{aligned} \% \text{degradation of labelled insulin by hepatocyte} \\ = \% \text{TCA soluble counts in experimental tube} \\ - \% \text{TCA soluble counts in control tube} \end{aligned}$$

XII. インスリン・デキストラン複合体

Cyanogen bromide で活性化したデキストラン T-70 を Sephadex G75 カラムで二重連続濾過して作製する Sakamoto らの方法¹²⁾によって作製した T-40 (分子量 150,000), T-70 (分子量 450,000) および T-2000 (分子量 2,000,000) の3種類の複合体を用いた。1g の複合体中にはインスリン 27.2 単位を含有している。

成 績

I. 無血清培地を用いた肝細胞の培養

1. 細胞接着に関するコーティング法の検討と、対照ラットおよび糖尿病ラットにおける接着率の差異

肝細胞は無血清培地を単独で用いた場合、培養皿へは殆んど接着せず、Lin らの方法¹⁰⁾に準じて予めウシ皮膚コラーゲンを培養皿にコーティングすることにより接着率は増加した。しかしコーティングに用いるコラーゲンの種類により接着率は異なった。即ち対照ラットでは基底膜由来の Type IV コラーゲンで $54.8 \pm 11.6\%$ と良好な接着率が得られたが、Type III コラーゲンでは Rubin らの方法¹¹⁾で $27.6 \pm 1.2\%$, Lin らの方法¹⁰⁾では $2.2 \pm 0.9\%$ といずれの方法でも低かった。Type III コラーゲンとフィブロネクチンとの併用コーティングでは $60.6 \pm 9.7\%$ と、Type IV コラーゲン単独使用以上の接着率が得られるとともに、細胞接着後の細胞の拡張、伸展も良好であった。なお実験の途中で Type IV コラーゲンが入手不能となったためフィブロネクチンと Type IV コラーゲンとの併用コー

ティングの検討はできなかった。対照ラットおよび糖尿病ラットから調製した細胞の間にはトリパンプルーによる非染色性に差異はなかった。表 2 に両群での接着率を検討した成績を示す。培養皿へ播種後 4 時間での接着率は、どのコーティング法においても対照ラッ

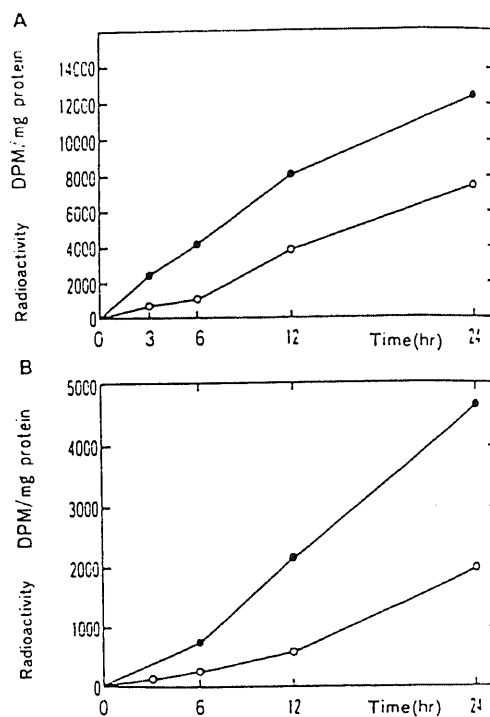


Fig. 1. Time course of synthesis of TCA insoluble proteins and albumin by rat hepatocytes in primary monolayer culture prepared from control rat (●—●) and STZ-induced diabetic rat (○—○). A, [14 C]-leucine incorporation to TCA insoluble proteins; B, [14 C]-leucine incorporation to albumin.

Table 2. Plating efficiency of inoculated rat hepatocytes to plastic dishes coated by various methods

	Fibronectin +Collagen III	Fibronectin	Collagen IV	Collagen III
Control Rat	60.6 ± 9.7	18.6 ± 7.2	54.8 ± 11.6	2.2 ± 0.9 (27.6 ± 1.2)**
STZ diabetic Rat	36.5 ± 7.4	8.1 ± 4.5	5.7 ± 2.3 (36.4 ± 9.8)*	2.0 ± 1.1

All values are expressed in percent

HI/WO₅/BA₂₀₀₀ was a culture medium.

STZDM Rat: Diabetic rat induced by injecting STZ a week before.

* Insulin (10^{-8} M) was added to culture medium.

** Collagen was dissolved according to the method of Rubin et al.¹¹⁾

Each value is the mean of 3 experiments \pm S.D.

トに対して糖尿病ラットの方が低下しており、本実験で用いた Type III コラーゲンとフィブロネクチンとを併用した方法でも対照ラットの $60.6 \pm 9.7\%$ に比して糖尿病ラットでは $36.5 \pm 7.4\%$ であった。

2. 対照ラットおよび糖尿病ラットにおける蛋白合成能の差異

図1に対照ラットおよび糖尿病ラットから調製した培養肝細胞の経時的な蛋白合成を示す。TCA 不溶性蛋白およびアルブミンの各合成とも糖尿病ラット培養肝細胞では対照ラットに比して低下していた。

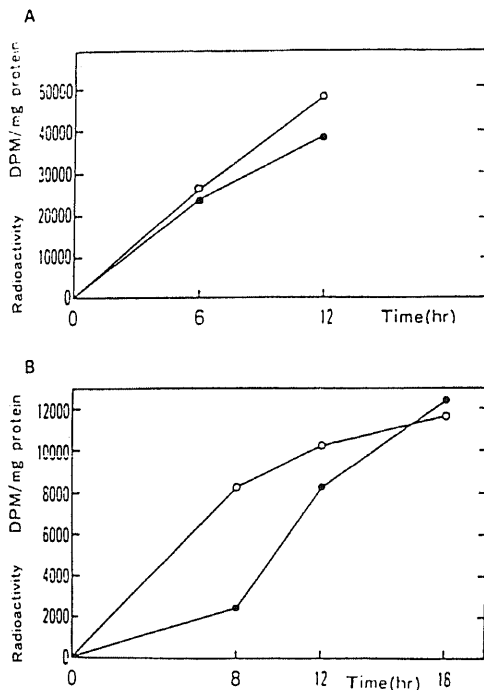


Fig. 2. Effect of insulin (10^{-8}M) on [^{14}C]-leucine incorporation to TCA insoluble proteins in cultured hepatocytes prepared from control rat (A) and STZ-induced diabetic (B). $\circ-\circ$, insulin (10^{-8}M) added; $\bullet-\bullet$, insulin free.

II. 培養肝細胞における蛋白合成に及ぼすインスリンの影響

図2は対照ラットおよび糖尿病ラットから調製した培養肝細胞にインスリンを添加した時のTCA不溶性蛋白合成の経時の変化を示す。対照ラットではインスリン添加により、TCA不溶性蛋白合成は培養12時間の時点でやや促進の傾向が認められた。一方糖尿病ラットでは明らかにインスリン添加による促進を認め、培養初期の蛋白合成量の低下が見られなくなった。アルブミン合成についてもインスリン添加による影響は同様で、図3に示す如く培養初期の合成が改善された。表3には培養肝細胞における接着率、TCA不溶性蛋白合成およびアルブミン合成の3項目についてのインスリン添加の影響を比較した成績を示す。対照ラッ

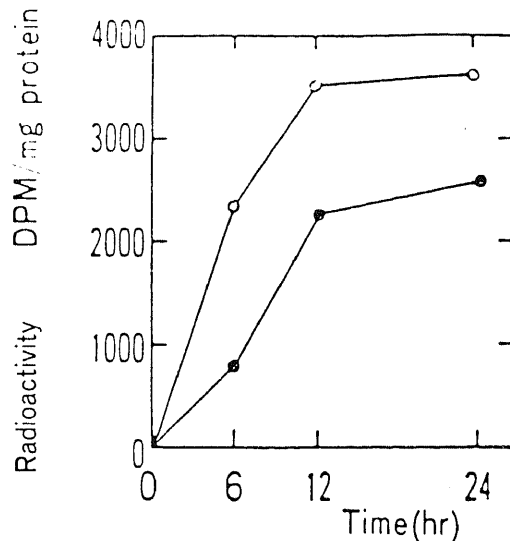


Fig. 3. Effect of insulin (10^{-8}M) on [^{14}C]-leucine incorporation to albumin synthesized in cultured hepatocytes prepared from STZ-induced diabetic rat. $\circ-\circ$, insulin added; $\bullet-\bullet$, insulin free.

Table 3. Plating efficiency, and synthesis of TCA insoluble protein and albumin, of cultured hepatocytes prepared from a control rat and STZ-induced diabetic rat

	Plating Efficiency		TCA Precipitate		Albumin Synthesis	
	Insulin(+)	Insulin(-)	Insulin(+)	Insulin(-)	Insulin(+)	Insulin(-)
Control Rat	134.4 ± 7.2	100	113.1 ± 8.9	100	117.6 ± 9.0	100
STZ diabetic Rat	41.9 ± 4.9	36.8 ± 5.2	40.3 ± 7.4	28.6 ± 2.9	36.5 ± 4.0	30.9 ± 3.6

All values are expressed in percent.
Each value is the mean of 3 experiments \pm S.D.

トから調製した培養肝細胞における、接着率、TCA 不溶性蛋白合成およびアルブミン合成を各々基準 (100%)とした場合、糖尿病ラット培養肝細胞での接着率、TCA 不溶性蛋白合成およびアルブミン合成は各々、 $36.8 \pm 5.2\%$ 、 $28.6 \pm 2.9\%$ および $30.9 \pm 3.6\%$ であった。次に培地に 10^{-8}M のインスリンを添加してみると、対照ラット培養肝細胞での接着率、TCA 不溶性

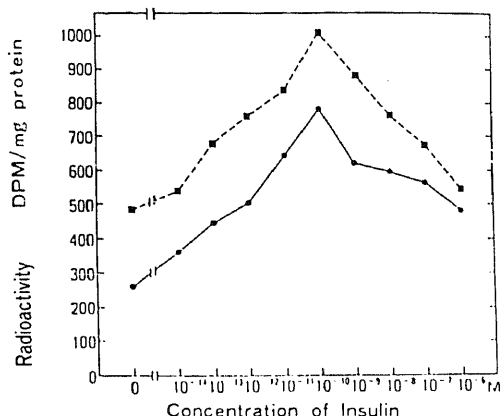


Fig. 4. Effect of increasing concentrations of insulin on the $[^{14}\text{C}]$ -leucine incorporation to albumin synthesized in cultured hepatocytes prepared from STZ-induced diabetic rat. ■---■, synthesis of albumin of cultured hepatocytes prepared from a STZ-induced diabetic rat incubated with insulin for 12 hr; ●—●, Synthesis of albumin of cultured hepatocytes prepared from a STZ-induced diabetic rat incubated with insulin for 6 hr.

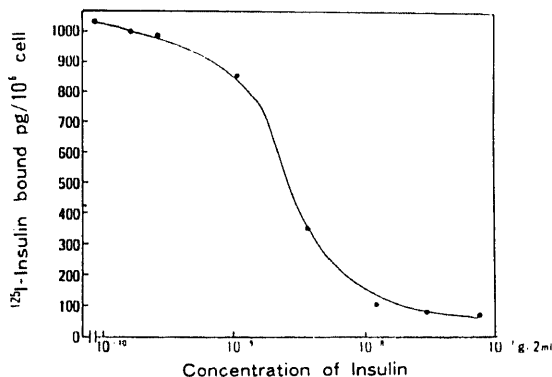


Fig. 5. Effect of increasing concentrations non-labelled insulin on $[^{125}\text{I}]$ -insulin binding to isolated hepatocytes prepared from STZ-induced diabetic rat.

蛋白合成およびアルブミン合成は、 $134.4 \pm 7.2\%$ 、 $113.1 \pm 8.9\%$ および $117.6 \pm 9.0\%$ を示した。一方糖尿病ラット培養肝細胞においてもインスリンを添加することで、接着率、TCA 不溶性蛋白合成およびアルブミン合成は、各々 $41.9 \pm 4.9\%$ 、 $40.3 \pm 7.4\%$ および $36.5 \pm 4.0\%$ と増加した。

添加インスリンの濃度に関しては、アルブミンの合成を指標として、培養細胞の実験系で検討を加えた。培養6時間および12時間におけるアルブミンの合成を最大にするインスリンの濃度は $10^{-11} \sim 10^{-10}\text{M}$ であり、図4に示すように、この濃度を境にして低濃度側では添加インスリンの10g濃度の増加とともにアルブミン合成の上昇を、高濃度側では逆に合成の低下を認めた。

III. インスリンレセプターの性状の検討およびインスリンの分解についての検討

1. レセプターの検討

図5に示すように非標識インスリンの各濃度で標識インスリンと糖尿病ラット肝細胞との結合は2相性を示した。この結果をスキッチャード解析した結果、図6のように糖尿病ラット肝細胞のインスリンレセプター性状については、 K_d は $4.4 \times 10^{-9}\text{M}$ で対照ラット (K_d $5.7 \times 10^{-9}\text{M}$)と差がなかったが、 B_{max} は $0.36 \times 10^{-3}\text{mol}/10^6\text{cell}$ で対照ラット ($0.18 \times 10^{-3}\text{mol}/10^6\text{cell}$)の約2倍であった。

2. インスリンの分解について

図7に示すように添加インスリンの分解曲線は対照

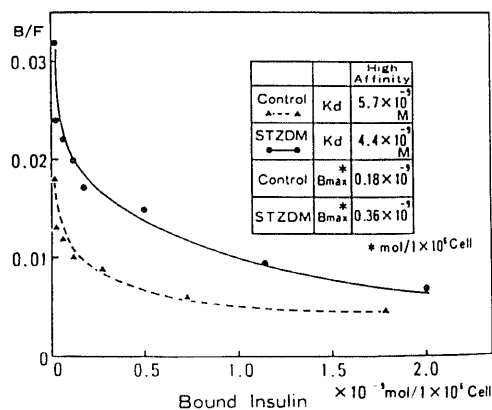


Fig. 6. Scatchard analysis of insulin binding to isolated hepatocytes prepared from STZ induced diabetic rat and control rat. Scatchard plots were constructed by determining the ratio of bound (B) to free (F) ligand and plotting this versus the amount of bound ligand.

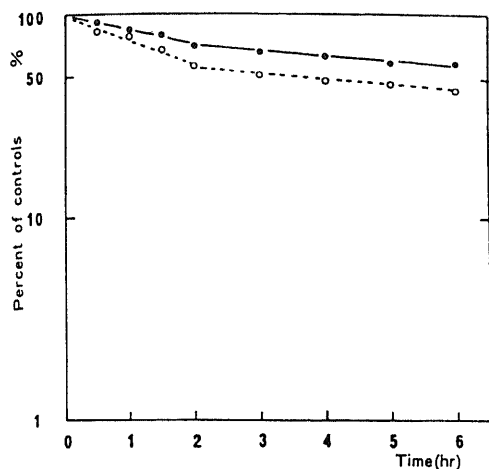


Fig. 7. Degradation of $[^{125}\text{I}]$ -insulin. Degradation of $[^{125}\text{I}]$ -insulin (10^{-10}M) was determined by precipitation in 10% TCA. In each experiment, appropriate control tubes were prepared that were identical to experimental tubes in all respects except that hepatocytes were omitted. ●—●, degradation curve in cultured hepatocytes prepared from control rat; ○—○, degradation curve in cultured hepatocytes prepared from STZ-induced diabetic rat.

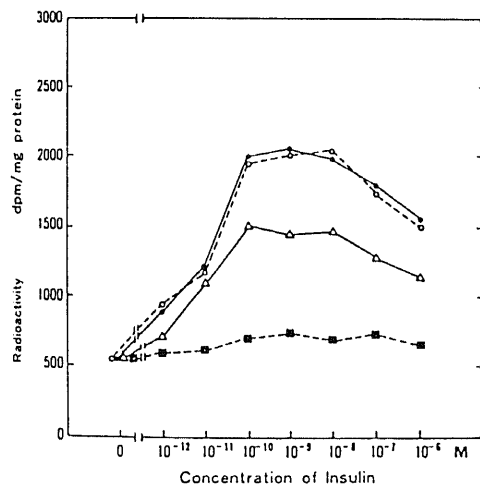


Fig. 8. The effect of insulin on protein synthesis in the cultured hepatocytes. The adult rat hepatocytes prepared from the STZ-induced diabetic rat were cultured with increasing concentrations of native insulin or insulin-dextran complexes in the medium containing $[^{14}\text{C}]$ -leucine for 12 hours. The rate of protein synthesis was measured by the radioactivities incorporated into TCA insoluble protein. ●—●, native insulin; ○—○, insulin-dextran complex I (T-40); \triangle — \triangle , insulin-dextran complex II (T-70); ■—■, insulin-dextran complex III (T-2000).

ラット、糖尿病ラットともに2相性を呈した。その分解の初期相での添加インスリンの半減期を $T_{1/2}^i$ 、後期相での添加インスリンの半減期を $T_{1/2}^e$ とすると、対照ラットでは $T_{1/2}^i=3.89$ 時間、 $T_{1/2}^e=16.7$ 時間であり、糖尿病ラットでは $T_{1/2}^i=54$ 分、 $T_{1/2}^e=6.13$ 時間であった。

IV. インスリン・デキストラン複合体の培養肝細胞における蛋白合成への影響

図8に各種インスリン・デキストラン複合体の濃度とTCA不溶性蛋白との関係を示す。T-40ではインスリン単独添加による効果とほとんど同様であったが、T-70、T-2000とデキストランの分子量が大きくなるにつれて、その複合体の蛋白合成に及ぼす影響が小さくなる傾向を示した。しかしT-70では明らかに蛋白合成の亢進が認められた。図9に示すように各種インスリン・デキストラン複合体の濃度とアルブミン合成との関係も同様の結果であった。図10は培養後12時間の糖尿病ラット肝細胞の位相差光顕像を示す。インスリンとT-40およびT-70では形態上の差異は観察されなかった。インスリン・デキストラン複合体(T-40、T-70)はインスリンと同様肝細胞の培養皿への接着率を高め、細胞の伸展を促進させた。表4にインスリン・デキストラン複合体の種類と、これらの複合体

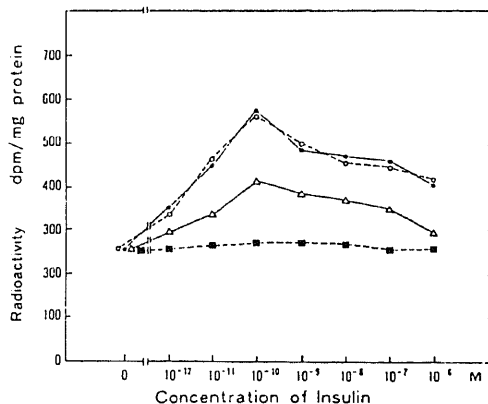


Fig. 9. The effect of insulin or insulin-dextran complexes on the albumin synthesis in the cultured hepatocytes. The adult rat hepatocytes prepared from the STZ-induced diabetic rat were cultured with increasing concentrations of native or insulin-dextran complexes in the medium containing $[^{14}\text{C}]$ -leucine for 12 hours. The rate of protein synthesis was measured by the radioactivities incorporated into immunoprecipitates by anti-rat albumin rabbit serum and antirabbit γ -globulin goat serum. Symbols are the same as in Fig. 8.

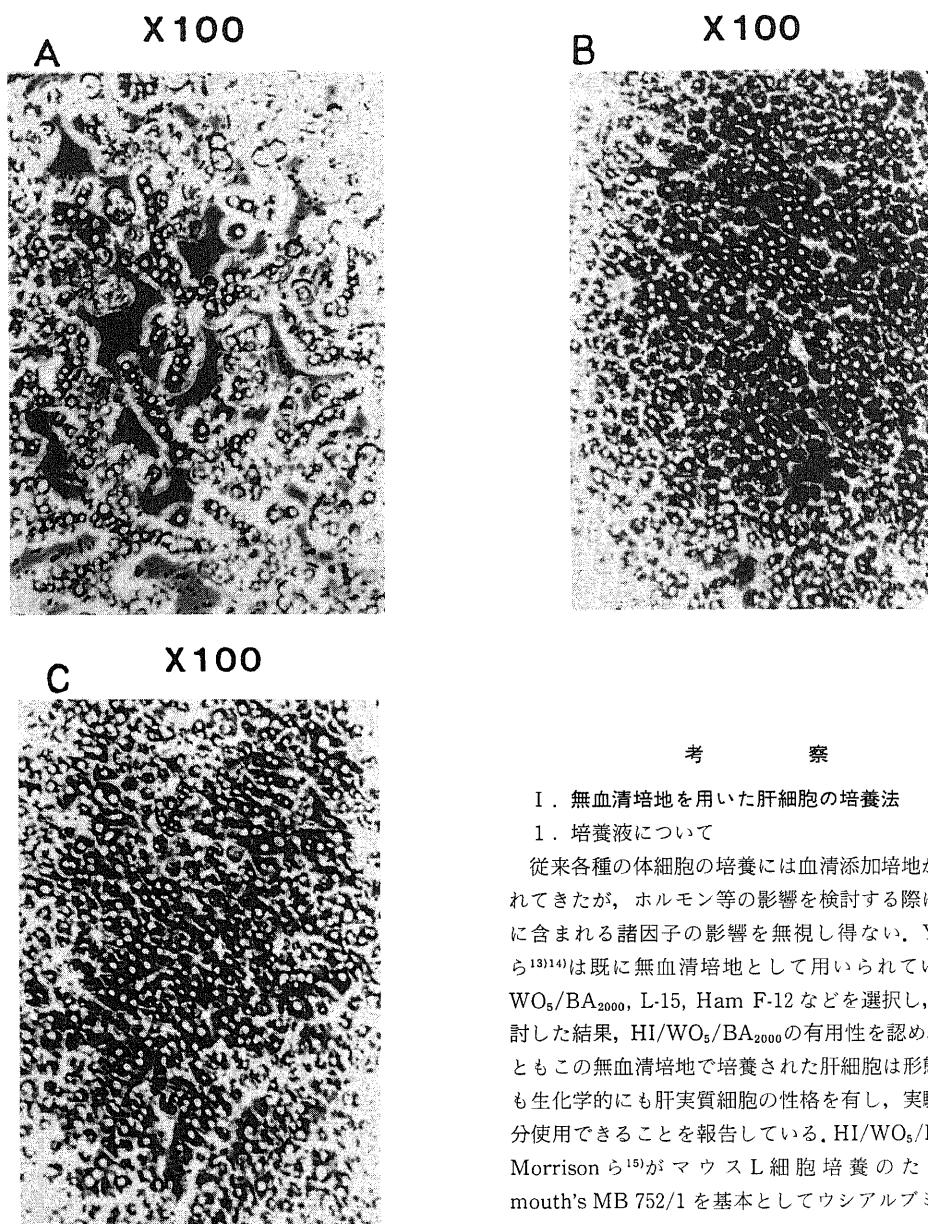


Fig. 10. Phase contrast micrographs of the cultured hepatocytes 12 hr after incubation. The adult rat hepatocytes prepared from STZ-induced diabetic rat were cultured without insulin (A), with insulin (B) and with insulin-dextran complex (C).

による不溶性 TCA の蛋白合成に及ぼす影響を、インスリンを基準とした時の百分率で示した。T-40 では $94.2 \pm 3.5\%$ 、T-70 では $67.5 \pm 4.8\%$ として T-2000 では $30.0 \pm 5.2\%$ であった。

考 察

I. 無血清培地を用いた肝細胞の培養法

1. 培養液について

従来各種の体細胞の培養には血清添加培地が用いられてきたが、ホルモン等の影響を検討するには血清に含まれる諸因子の影響を無視し得ない。Yamada ら¹³⁾¹⁴⁾は既に無血清培地として用いられている HI/WO₅/BA₂₀₀₀, L-15, Ham F-12 などを選択し、比較検討した結果、HI/WO₅/BA₂₀₀₀の有用性を認め、少なくともこの無血清培地で培養された肝細胞は形態学的にも生化学的にも肝実質細胞の性格を有し、実験系に十分使用できることを報告している。HI/WO₅/BA₂₀₀₀は Morrison ら¹⁵⁾がマウス L 細胞培養のため Waymouth's MB 752/1 を基本としてウシアルブミン 2000 mg/L (0.2%)、オレイン酸 5 mg/L を加え、Bonney らにより初めて肝細胞培養に用いられた培養液である。この培養液のもう 1 つの特徴は高濃度グルコース (5000 mg/L) を含んでいることである。この高濃度グルコースは培養肝細胞のグリコーゲン分解を抑制し、その結果細胞の autophagocytosis を防止するため細胞の微細構造を維持できる作用があると考えられている¹⁷⁾。高濃度グルコースが肝細胞の代謝にどのような影響を与えるかは不明であるが、少なくとも浸透圧は 293.6 m Osm/L であり、他の培地と比較しても差を認めなかった。

Table 4. Relative potencies of three kinds of insulin-dextran complexes in the stimulation of protein synthesis in the cultured rat hepatocytes as compared with native insulin

Insulin and Insulin-Dextran Complexes	Molecular Weight of Dextran	Relative Potencies in the Stimulation of Protein Synthesis
Native insulin		100%
Complex I, T-40	150,000	94.2±3.5%
Complex II, T-70	450,000	67.5±4.8%
Complex III, T-2000	2,000,000	30.0±5.2%

The adult rat hepatocytes prepared from the STZ-induced diabetic rat were cultured with native or insulin-dextran complexes in the medium containing [14 C]-leucine for 12 hours. The rate of protein synthesis was measured by the radioactivities incorporated into TCA insoluble protein. Each value is the mean of 3 experiments \pm S.D.

2. コーティングについて

成熟ラット肝細胞は通常の培養状態においては分裂増殖しない。また他の体細胞に比して培養皿への接着能力が劣る。ことに培養当初より無血清培地を使用すると、培養皿への接着率が極めて悪く、このため単層の形成は不可能である。従って成熟ラット肝細胞初代培養法のもう一つの重要な点は、いかに肝細胞を効率良く培養皿に接着させるかということである。そこで一旦血清添加培地で培養を開始し、十分な単層形成を認めた後無血清培地に置換する方法が考えられるが、この方法でもインスリンやデキサメサゾンが添加されなければ6～12時間で細胞の機能や形態が十分には維持できなくなるとの報告もみられる¹³⁾。実際著者の実験でも血清添加培地で接着させ、その後無血清培地に置換した後、培養6時間で観察してみると細胞の接着、伸展が悪く、更に12時間後では多くの細胞が培養皿より剥離し浮遊する状態であった。そこで無血清培地では血清の有する細胞に対する接着、伸展などの安定化作用が期待できないことから、培養皿へのコーティングを検討した。Linらの方法¹⁰⁾に準じてウシコラーゲンをコーティングしてみると、Type IVコラーゲンをういた時にType IIIコラーゲンに比して良好な接着率を得た。これはType IVコラーゲンが基底膜由来であるのに対してType IIIコラーゲンは皮膚結合組織由来であり、基底膜由来のものがより細胞の接着を促進させるものと考えられる。一方フィブロネクチンは細胞の接着に重要な役割を果たしていると報告されている¹⁸⁾¹⁹⁾。フィブロネクチンは高分子粘性糖蛋白で、細胞表面、結合組織、血清、脳脊髄液中に存在している。細胞性フィブロネクチンは分子量22～25万のサブユニットの2量体または多量体からなっている²⁰⁾。また血漿性フィブロネクチンは分子量20～22万のサブユニットの2量体からなり、以前は cold in-

soluble globulin と呼ばれていた²¹⁾。これらのフィブロネクチンは細胞の基質および細胞への接着と細胞移動を促進させると考えられている²²⁾。また細胞表面のフィブロネクチンは分離細胞がコラーゲンと接着するのを促進させ、特にType IIIコラーゲンとの接着が最も良いと報告されている²³⁾。今回の検討においても、Type IIIコラーゲンとフィブロネクチンでコーティングすることで、正常ラット肝細胞および糖尿病ラット肝細胞の接着が改善するとともに、安定した成績が得られた。さらに培養皿への接着後の細胞の拡張、伸展も良好で、図10の如く多角形の細胞は互いに接し単層を形成しており、あたかも肝組織切片の光顕像を見ているような像が得られ、形態上も安定していると考えられた。

II. 培養肝細胞における蛋白合成およびインスリンの影響

1. 培養肝細胞の条件について

培養肝細胞における代謝を論じる際には、肝細胞の培養条件が十分考慮されなければならない。分離直後の遊離肝細胞では細胞分離時の化学的、物理的破壊のため、細胞機能が低下している²⁴⁾。一方血清添加培地で肝細胞を長期培養すると、培養10日目頃から細胞は紡錘形を呈するようになり、本来の肝実質細胞とは形態的にも機能的にも異なった細胞への変化を認めたとの報告もある。これらを考慮すると、生体の肝細胞と形態上も機能上もほぼ同等の状態にある培養肝細胞を実験に供するためには、実験系の時間的条件の設定が必要となる。Kletzienら²⁵⁾は分離直後の肝細胞はアミノ酸の能動輸送を失なっているが、2～3時間培養すると回復が認められたと報告している。またBissellら²⁶⁾も分離肝細胞ではアミノ酸や種々の陽イオンの膜透過性に対する制御が乱れており、さらにポリゾームの崩壊も認められるが、分離後4時間の培養ではこれらの

障害が改善されたと報告している。Tanaka ら¹⁷⁾は肝での合成蛋白であるフィブリノーゲン、トランスフェリンの合成と各種アミノ酸の代謝を培養肝細胞で検討した結果、少なくとも培養3日間は生体の肝細胞と同等の代謝を示すと報告している。これらの研究を検討した結果、著者は培養開始4時間を基準とし、それに継続する24時間の培養肝細胞を実験に供した。この条件設定により本実験では生体の肝細胞における代謝とほぼ同等の代謝が反映されるものと考えた。

2. 蛋白合成に及ぼすインスリンの影響について

体細胞の蛋白合成に及ぼすインスリンの影響については、蛋白合成速度の増加²⁷⁾²⁸⁾²⁹⁾、アミノ酸摂取率の増加³⁰⁾および蛋白分解速度の減少³¹⁾の3つの機序による蛋白合成促進作用が報告されている。Stranchfield ら²⁷⁾は初代培養肝細胞を用いて、インスリンによって蛋白合成能が促進されることを報告している。著者の実験でも対照ラットおよび糖尿病ラットから調製した培養肝細胞でインスリンの蛋白合成へ及ぼす影響を検討したが、糖尿病ラットでは明らかに合成促進を認めなかった。この成績の相違は、Stranchfield ら²⁷⁾の実験では培養初期からインスリンを添加しており、また血清添加培地を使用している点など培地の性状や培養条件の差異によるものと考えられた。

3. インスリンレセプターの性状について

Goldfine ら²⁾は蛋白合成経路に及ぼすインスリン作用をレセプター（細胞膜）およびポストレセプター機構（細胞内）に大別している。著者はインスリンの蛋白合成促進作用が対照ラットに比して糖尿病ラットでより著明であった事実をレセプターの面で検討した。糖尿病ラットと対照ラットの培養肝細胞では、レセプターのインスリン親和性については差異を認めなかったが、レセプター数は対照ラットに比して糖尿病ラットでは約2倍であった。これは Davidson ら³²⁾の成績とほぼ一致する結果である。この事実は対照ラットと糖尿病ラットの培養肝細胞におけるインスリンに対する応答性（感受性）の差異が、少なくともこのようなレセプターの性状の差異に基づくことを示唆している。

4. インスリンの分解について

糖尿病ラットおよび対照ラットの培養肝細胞において認められたインスリンによる蛋白合成促進作用の差異を、添加インスリンの分解の面からも検討を加えた。添加インスリンの分解曲線は、両者とも2相性を示したが、糖尿病ラット培養肝細胞における添加インスリンの半減期は、対照ラットに比して短縮していた。この差異は恐らくゴルジ装置への輸送過程や、分解速度

などに相違があるものと思われるが、本稿ではこの点の検討をしていないため不明である。一方インスリン添加の実験は、今回検討したインスリンの半減期を考慮して、すべて培養6時間毎にインスリンを再添加しており、この点からは添加インスリンに前述した如き蛋白合成促進作用の差異の原因を求めることはできないと考える。

III. インスリン・デキストラン複合体の培養肝細胞における蛋白合成への影響

インスリン作用の第一歩は細胞膜のレセプターとの結合である。次のステップとしては degradation と internalization であるが²⁾、細胞でのこれらの過程については未だ統一した結論がでていない³³⁾。インスリンレセプターについても、細胞膜だけでなく核、小胞体、ゴルジ装置などの細胞内小器官についてもレセプターサイトがあると報告されている³⁴⁾。さらに Goldfine ら³⁵⁾によれば、核のインスリンレセプターは細胞膜レセプターと免疫上ことなると述べている。しかしこれらの各種のレセプターがインスリン作用としての機能にどのような役割を演じるかということは不明である³⁶⁾。この疑問を解明する手段に用いるため、Sakamoto ら¹²⁾は、細胞膜を通過することができなく、また遊離インスリンを放出することがないインスリン・デキストラン複合体を作製した。この複合体を用いて Sakamoto ら³⁷⁾はミトコンドリアのピルビン酸脱素酵素、pyruvate dehydrogenase (PDH) の活性がインスリン・デキストラン複合体により活性化されたことを報告している。また脂肪細胞を用いて¹²⁵Iで標識したインスリン・デキストラン複合体の細胞内での分布を検討した結果、インスリンレセプターとの結合は細胞膜のみにしか認められなかったことを報告している。以上の結果から Sakamoto ら³⁸⁾は、上記のPDH 活性化は、インスリンの核レセプターとの結合とは無関係で、細胞膜のみとの結合で誘導されたものと結論している。本実験でも3種類の複合体(T-40, T-70, T-2000)を用いて蛋白合成に及ぼす影響を検討したが、これらの複合体はいずれも蛋白合成を促進させた。この事実は培養肝細胞において、蛋白合成に対するインスリン作用の発現にはインスリンが細胞内へ取り込まれる必要がない事を示している。さらに、蛋白合成能への効果の発現には段階的な差が認められたが、これは巨大分子である程、細胞表面のレセプターサイトがデキストランで占拠されるために、複合体中のインスリンのレセプターへの結合が低下し、その結果インスリン作用が減少するものと考えられた。

今回の実験を通して蛋白合成は、インスリンの濃度依存的に増加する傾向を示したが、高濃度のインスリ

ンを培地に添加すると、むしろ合成が低下する傾向を認めた。このような現象について、Nakamura ら³⁹⁾は高濃度インスリンはDNA合成の抑制を引き起こす結果、蛋白合成が減少すると報告している。一方レセプターの面からはBlackard ら⁴⁰⁾が、いわゆる Down regulation と称する機構が関与することを報告しているが、現時点では確立された結論は文献上でも定まっていない⁴¹⁾。

結 論

インスリンの中間または長期効果の作用機序を解明する目的で、対照ラットおよび糖尿病ラットから調製し、無血清培地下で培養した培養肝細胞を用いて、蛋白合成におよぼすインスリンの影響を検討した。その結果、次の成績を得た。

1. 糖尿病ラット培養肝細胞における蛋白合成は、対照ラット培養肝細胞に比して低下していた。
2. 培地にインスリンを添加することにより、糖尿病ラット培養肝細胞での蛋白合成は増加した。
3. 糖尿病ラット培養肝細胞では、対照ラットに比し、インスリンに対する感受性の増大が認められ、この差異は一部レセプター数の増加によると考えられた。
4. 糖尿病ラット培養肝細胞での $[^{125}\text{I}]$ インスリンの分解は、対照ラット培養肝細胞に比して促進していた。
5. 細胞内に取り込まれないインスリン・デキストラン複合体は、培養肝細胞における蛋白合成を増加させた。
6. 蛋白合成は、添加インスリンの濃度依存的に増加したが、 $10^{-10} \sim 10^{-7}\text{M}$ にて最大効果を示した。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲をたまわった竹田亮祐教授に心からの謝意を表します。また終始、直接御指導、御教示下さった中井継彦博士(現、福井医科大学第3内科助教授)に深甚の謝意を示します。

文 献

- 1) Karlsson, F. A., Grunfeld, C., Kahn, C. R. & Roth, J.: Regulation of insulin receptors and insulin responsiveness in 3T3-L1 fatty fibroblasts. *Endocrinology*, **104**, 1383-1392 (1979).
- 2) Goldfine, I. D., Smith, G. J., Wong, K. Y. & Jone, A. L.: Cellular uptake and nuclear binding of insulin in human cultured lymphocytes: Evidence for potential intracellular sites of insulin

action. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **74**, 1368-1372 (1977).

- 3) Freychet, P., Kahn, R., Roth, J. & Neville, D. M., Jr.: Insulin interactions with liver plasma membranes. *J. Biol. Chem.*, **274**, 3953-3961 (1972).
- 4) Nakai, T., Yamada, S., Tamai, T., Kobayashi, T., Hayashi, T. & Takeda, R.: The effects of streptozotocin diabetes on hepatic triglyceride lipase activity in the rat. *Metabolism*, **28**, 30-40 (1979).
- 5) Goldfine, I. D.: Insulin receptors and the site of action of insulin. *Life Sci.*, **23**, 2639-2648 (1978).
- 6) Jefferson, L. S.: Role of Insulin in the regulation of protein synthesis. *Diabetes*, **29**, 487-496 (1980).
- 7) Berry, M. N. & Friend, D. S.: High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. *J. Cell. Biol.*, **43**, 506-620 (1969).
- 8) Junod, A., Lambert, A. E., Stauffacher, W. & Remold, A. E.: Diabetogenic action of streptozotocin: Relationship of dose to metabolic response. *J. Clin. Invest.*, **48**, 2129-2139 (1969).
- 9) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J.: Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
- 10) Lin, R. C. & Snodgrass, P. J.: Primary culture of normal adult rat liver cells which maintain stable urea cycle enzymes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **64**, 725-734 (1975).
- 11) Bubin, K., Oldberg, Å., Höök, M. & Öbrink, B.: Adhesion of rat hepatocytes to collagen. *Exp. Cell Res.*, **117**, 165-177 (1978).
- 12) Sakamoto, Y., Akanuma, Y., Kosaka, K. & Jeanrenaud, B.: Comparative effects of native insulin and insulin-dextran complexes on the metabolism of adipose tissue. *Biochem. Biophys. Acta*, **498**, 102-113 (1977).
- 13) Yamada, S., Otto, P. S., Kennedy, D. L. & Whayne, T. F., Jr.: The effects of dexamethasone on metabolic activity of hepatocytes in primary monolayer culture. *In Vitro*, **16**, 559-570 (1980).
- 14) Yamada, S., Nakai, T., Kutsumi, Y., Takeda, R., Kurakane, K., Otto, P. S., Kennedy, D. L. & Whayne, T. F., Jr.: Primary monolayer culture of adult rat hepatocytes in a serum-free system: Metabolic and morphological studies. *Biomed. Res.*,

2, 491-500 (1981).

15) **Morrison, S. J. & Jenkin, H. M.** : Growth of chlamydia psittaci strain eningopneumonitis in mouse L cells cultivated in a defined medium in spinner cultures. *In Vitro.*, **8**, 94-100 (1972).

16) **Bonney, R. J., Becker, J. E., Walder, P. R. & Potter, V. R.** : Primary monolayer cultures of adult rat liver parenchymal cells suitable for study of the regulation of enzyme synthesis. *In Vitro.*, **9**, 399-413 (1973).

17) **Tanaka, K., Sato, M., Tomita, Y. & Ichihara, A.** : Biochemical studies on liver functions in primary cultured hepatocytes of adult rats. *J. Biochem.*, **84**, 937-946 (1978).

18) **Millis, A. J. T. & Hoyle, T.** : Fibroblast-conditioned medium contains cell surface proteins required for cell attachment and spreading. *Nature*, **271**, 668-669 (1978).

19) **Marceau, N., Noel, M. & Deschenes, J.** : Growth and functional activities of neonatal and adult rat hepatocytes cultured on fibronectin coated substratum in serum-free medium. *In Vitro.*, **18**, 1-11 (1982).

20) **Yamada, K. M., Schlesinger, D. H. Kennedy, D. W. & Rastan, I.** : Characterization of a major fibroblast cell surface glycoprotein. *Biochemistry*, **16**, 5552-5559 (1977).

21) **Yamada, K. M. & Olden, K.** : Fibronectin-adhesive glycoproteins of cell surface and blood. *Nature*, **275**, 179-184 (1978).

22) **Ichihara, A., Nakamura, T. & Tanaka, K.** : Use of hepatocytes in primary culture for biochemical studies on liver functions. *Mol. Cell. Biochem.*, **43**, 145-160 (1982).

23) **Engvall, B., Ruoslahti, E. & Miller, E. J.** : Affinity of fibrinectin to collagens of different genetic types and to fibrinogen. *J. Exp. Med.*, **147**, 1584-1595 (1978).

24) **Nakai, T., Otto, P. S., Kennedy, D. L. & Whayne, T. F., Jr.** : Rat high density lipoprotein subfraction (HDL₃) uptake and catabolism by isolated rat liver parenchymal cells. *J. Biol. Chem.*, **251**, 4914-4921 (1976).

25) **Kletzien, R. F., Pariza, M. W., Becker, J. E., Potter, V. R. & Butcher, F. R.** : Induction of amino acid transport in primary cultures of adult rat liver parenchymal cells by insulin. *J. Biol.*

Chem., **251**, 3014-3020 (1976).

26) **Bissell, D. M., Hammaker, L. E. & Meyer, U. A.** : Parenchymal cells from adult rat liver in nonproliferating monolayer culture. *J. Cell. Biol.*, **59**, 722-734 (1973).

27) **Stanchfield, J. E. & Yager, J. D., Jr.** : Insulin effects on protein synthesis and secretion in primary culture of amphibian hepatocytes. *J. Cell. Physiol.*, **100**, 279-289 (1979).

28) **Crane, L. J. & Miller, D. L.** : Plasma protein synthesis by isolated rat hepatocytes. *J. Cell. Biol.*, **72**, 11-25 (1977).

29) **Clark, R. L. & Hansen, R. J.** : Insulin stimulates synthesis of soluble proteins in isolated rat hepatocytes. *Biochem. J.*, **190**, 615-619 (1980).

30) **Risser, W. L. & Gelehrter, T. D.** : Hormonal modulation of amino acid transport in rat hepatoma cells in tissue culture. *J. Biol. Chem.*, **248**, 1248-1254 (1973).

31) **Mortimore, G. E., Woodside, K. H. & Henry, J. E.** : Compartmentation of free valine and its relation to protein turnover in perfused rat liver. *J. Biol. Chem.*, **27**, 2776-2784 (1972).

32) **Davidson, M. B. & Kaplan, S. A.** : Increased insulin binding by hepatic plasma membranes from diabetic rats. *J. Clin. Invest.*, **59**, 22-31 (1977).

33) **Gavin, J. R., Roth, J., Jen, P. & Freychet, P.** : Insulin receptors in human circulating cells and fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **69**, 747-751 (1972).

34) **Bergeron, J. J. M., Evans, W. H. & Geshwind, I. I.** : Insulin binding to rat liver Golgi fractions. *J. Cell. Biol.*, **59**, 771-775 (1973).

35) **Goldfine, I. D., Vigneri, R., Cohen, D. & Fliam, N. B.** : Intracellular binding sites for insulin are immunologically distinct from those on the plasma membrane. *Nature*, **269**, 698-700 (1977).

36) **Horvat, A., Li, E. & Katsoyannis, P. G.** : Cellular binding sites for insulin in rat liver. *Biochem. Biophys. Acta*, **382**, 609-620 (1975).

37) **Sakamoto, Y. & Kuzuya, T.** : Stimulation of pyruvate dehydrogenase activity by insulin-dextran in mouse adipose tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **88**, 37-43 (1979).

38) **Sakamoto, Y. & Kuzuya, T.** : Study of insulin action by use of insulin dextran complex : Uptake of insulin into subcellular fractions and stimulation

of pyruvate dehydrogenase in mouse adipocytes, In insulin, p447-454, In Bradenbury, D. & Wollmer, A. (ed). Chemistry, structure and function of insulin and related hormones. Walter de Gruyter, Berlin, 1980.

39) Nakamura, T., Shinno, H. & Ichihara, A.: Insulin and glucagon as a new regulator system for tryptophan oxygease activity demonstrated in primary cultured rat hepatocytes. J. Biol. Chem.,

255, 7533-7535 (1980).

40) Blackard, W. G., Guzelian, P. S. & Small, M. E.: Down regulation of insulin receptors in primary cultures of adult rat hepatocytes in monolayer. Endocrinology, **103**, 548-553 (1978).

41) Caro, J. F. & Amatrude, J. M.: Insulin receptors in hepatocytes: Postreceptor events mediate down regulation. Science, **210**, 1029-1031 (1980).

The Effect of Insulin on Protein Synthesis in Primary Monolayer Culture of Adult Rat Hepatocytes Yasunori Kutsumi, Department of Internal Medicine II, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 — J. Juzen Med. Soc., **94**, 495—508 (1985)

Key words: serum free medium, protein synthesis, insulin, cultured hepatocytes

Abstract

The purpose of the present study was to examine the mechanisms of the long-term effects of insulin on protein synthesis in the cultured hepatocytes.

Isolated liver parenchymal cells were prepared from an adult normal rat (control rat) and/or a streptozotocin induced diabetic rat (diabetic rat). To avoid the effects of serum factors, the hepatocytes were cultured in the complete synthetic serum free media HI/WO₅/BA₂₀₀₀ under 5% CO₂/95% air at 37°C. The optimum condition for cell attachment to plastic dishes (60 mm) was determined. The cultured hepatocytes well maintained the metabolic and morphological characteristics of the adult rat liver during first 24 hours after cell inoculation. The incorporation of [¹⁴C]-leucine into trichloroacetic acid (TCA)-insoluble proteins and immunoprecipitates by anti-rat albumin serum were measured in cultured hepatocytes prepared from the diabetic rat and the control rat.

Time course of TCA-insoluble protein and albumin synthesis in cultured hepatocytes from diabetic and control rats indicated that the synthesis was found to be linear over the incubation period of 24 hours. However, synthesis of TCA-insoluble protein and albumin by hepatocytes prepared from the diabetic rat was markedly decreased as compared with that of the control rat.

Total protein synthesis was not affected by insulin in cultured hepatocytes prepared from the control rat. When 10⁻⁸ M insulin was added to the medium of hepatocytes prepared from the diabetic rat, the initial rate (0-6 hr) of protein synthesis was increased approximately 4 times.

Scatchard analysis revealed that both cultured hepatocytes from the diabetic rat and the control rat had a major insulin-binding sites with K_d of approximate 4.4-5.7×10⁻⁹ M. Cultured hepatocytes from the diabetic rat, however, had twice as many receptors per cell as control hepatocytes. Furthermore, insulin degradation was rapider in cultured hepatocytes from the diabetic rat than that from the control rat. In contrast, cultured hepatocytes from the diabetic rat was much more sensitive to the hormones. This increase in sensitivity of cultured hepatocytes from the diabetic rat most likely reflects an increase in the number of insulin receptors present.

Finally, it was demonstrated that protein synthesis of cultured hepatocytes was induced by the extracellularly incubated insulin-dextran complexes as well as native insulin. Three kinds of soluble and stable insulin-dextran complexes (I, Mr 150,000; II, Mr 450,000; III, Mr 2,000,000) were prepared. The maximal effect of insulin-dextran complex (I) on protein synthesis was comparable to native insulin. However, insulin-dextran complex (II) caused a 67% stimulation of native insulin. Insulin-dextran complex (III) induced only a slight increase in protein synthesis. These results support the view that the stimulation by insulin of protein synthesis in rat hepatocytes does not require the entry of insulin into cell.